



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 24 199 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 07 K 16/00
C 07 K 7/06
A 61 K 38/08
C 12 N 15/12

②① Aktenzeichen: 199 24 199.6
②② Anmeldetag: 27. 5. 1999
④③ Offenlegungstag: 30. 11. 2000

DE 199 24 199 A 1

⑦① Anmelder:
Boehringer Ingelheim International GmbH, 55218
Ingelheim, DE

⑦② Erfinder:
Adolf, Günther, Dr., Wien, AT; Heider, Karl-Heinz,
Dr., Stockerau, AT; König, Ulrich, Dipl.-Ing., Wien,
AT; Sommergruber, Wolfgang, Dr., Purkersdorf, AT;
Adolf, Günther R., Dr., Wien, AT; Heider, Karl-Heinz,
Dr., Stockerau, AT; König, Ulrich, Dipl.-Ing., Wien,
AT; Sommergruber, Wolfgang, Dr., Pukersdorf, AT

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Tumorassoziertes Antigen
⑤⑦ Tumorassoziertes Antigen, davon abgeleitete immu-
nogene Peptide und dafür kodierende DNA-Moleküle so-
wie deren Verwendung in der Immuntherapie von Krebs-
erkrankungen.

DE 199 24 199 A 1

Die Erfindung bezieht sich auf die Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen zu schützen bzw. diese aktiv zu bekämpfen. Die Bedeutung eines intakten Immunsystems zeigt sich vor allem bei vererbten oder erworbenen Immundefizienzen. Der Einsatz von prophylaktischen Vakzinprogrammen erwies sich in vielen Fällen als äußerst zielführende und erfolgreiche immunologische Intervention im Kampf gegen virale oder bakterielle Infektionskrankungen. Weiters hat sich gezeigt, daß das Immunsystem auch an der Eliminierung von Tumorzellen maßgeblich beteiligt ist. Dabei spielt die Erkennung der tumorassozierten Antigene (TAAs) durch Komponenten des Immunsystems eine wesentliche Rolle. Im weitesten Sinn kann jede (peptidische oder nicht peptidische) Komponente einer Tumorzelle, die von einem Element des Immunsystems erkannt und zur Stimulation einer immunologischen Antwort führt, als immunogenes Tumorantigen fungieren. Besondere Bedeutung kommt dabei jenen Tumorantigenen zu, die nicht nur eine immunologische Reaktion hervorrufen, sondern auch eine Abstoßung des Tumors bewirken. Die Identifizierung definierter Antigene, die solch eine immunologische Reaktion bewirken können, stellt einen wichtigen Schritt für die Entwicklung einer molekular definierten Tumorstoffe dar. Obwohl noch nicht ganz geklärt ist, welche Elemente des Immunsystems für eine Abstoßung des Tumors verantwortlich sind, besteht doch ein Konsens darüber, daß dabei CD8-exprimierende zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) eine Hauptrolle spielen (Coulie, 1997). Besonders bei jenen Tumorenten (z. B. Melanom und Nierenkarzinom), die eine relativ hohe Spontanremissionsrate aufweisen, konnte eine Korrelation zwischen klinischem Verlauf und dem vermehrten Auftreten von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen festgestellt werden (Schendel et al., 1993; Mackensen et al., 1993; Halliday et al., 1995; Kawakami et al., 1995; Kawakami et al., 1996; Wang, 1997; Celluzzi und Falo, 1998). Dabei wurden spezifische CTL-Klone entweder aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) oder peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) nach Kokultivierung mit meist autologen Tumorzellen und Zytokinstimulation in vitro erhalten. Sowohl in Tiermodellen als auch in in vitro kultivierten humanen Zellkultursystemen konnte die T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen durch Transfektion der Tumorzellen mit Zytokinen verstärkt werden (von Elsas et al., 1997; Gansbacher et al., 1990; Tepper et al., 1989; Fearon et al., 1990; Dranoff et al., 1993).

Aufgrund der Korrelation zwischen Remission und Beteiligung von CD8⁺-T-Zellen ist die Identifizierung tumorassoziierter Antigene (TAA), die durch CD8-positive CTLs erkannt werden, ein erklärtes Hauptziel auf dem Weg zur Entwicklung einer Tumorstoffe (Pardoll, 1998; Robbins und Kawakami, 1996). Ob auch andere Zelltypen des Immunsystems wie z. B. CD4⁺-T-Helferzellen eine wesentliche Rolle spielen ist noch unklar; einige Studien mit MAGE-3/HLA-A1 Peptiden in Melanompatienten deuten darauf hin (Marchand et al., 1995; Boon et al., 1998). In den vergangenen Jahren ist eine Reihe von TAAs, die durch CTLs erkannt werden, identifiziert worden (Boon et al., 1994; von den Eynde und von der Bruggen, 1997).

T-Zellen erkennen Antigene als Peptidfragmente, die an Zelloberflächen von MHC-Molekülen ("major histocompatibility complex", im Menschen "HLA" = "human leukocyte antigen") präsentiert werden. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-I Moleküle kommen auf den meisten Zellen mit Kern vor und präsentieren Peptide (üblicherweise 8–10-Mere), die durch proteolytischen Abbau endogener Proteine entstehen (sog. Antigen-Verarbeitung, "antigen processing"). Peptid:MHC-I Komplexe werden von CD8-positiven CTLs erkannt. MHC-II Moleküle kommen nur auf sog. "professionellen antigen-präsentierenden Zellen" (APC) vor, und präsentieren Peptide exogener Proteine, die im Zuge der Endocytose von APC aufgenommen und verarbeitet werden. Peptid:MHC-II Komplexe werden von CD4-Helfer-T-Zellen erkannt. Durch eine Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Peptid:MHC Komplex können verschiedene Effektormechanismen ausgelöst werden, die im Fall von CTLs zur Apoptose der Zielzelle führen. Das geschieht, wenn entweder der MHC (z. B. im Fall der Transplantatabstoßung), oder das Peptid (z. B. im Fall intrazellulärer Pathogene) als fremd erkannt wird. Allerdings erfüllen nicht alle präsentierten Peptide die strukturellen und funktionellen Anforderungen für eine effektive Interaktion mit T-Zellen (wie von Rammensee et al., 1995 und weiter unten beschrieben).

Für den Einsatz von TAAs in einer Tumorstoffe sind grundsätzlich mehrere Applikationsformen möglich: Das Antigen kann entweder als rekombinantes Protein mit geeigneten Adjuvantien bzw. Trägersystemen, oder als für das Antigen kodierende cDNA in Plasmid- (DNA-Vakzine; Tighe et al., 1998), bzw. viralen Vektoren (Restifo, 1997) appliziert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von rekombinanten Bakterien (z. B. *Listeria*, *Salmonella*), die das humane Antigen rekombinant exprimieren und durch ihre zusätzlichen Komponenten eine adjuvative Wirkung haben (Paterson, 1996; Pardoll, 1998). In allen diesen Fällen ist eine Verarbeitung und Präsentation des Antigens durch sog. "professionelle antigen-präsentierende Zellen" (APC) notwendig. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz synthetischer Peptide (Melief et al., 1996), die den korrespondierenden T-Zell-Epitopen des Antigens entsprechen und die entweder von außen auf die APC geladen (Buschle et al., 1997; Schmidt et al., 1997) oder von den APC aufgenommen und intrazellulär auf die MHC I Moleküle transferiert werden. Die therapeutisch effizienteste Applikationsform für ein definiertes Antigen wird im allgemeinen in klinischen Studien bestimmt.

Zu den von tumorspezifischen CTLs erkannten Antigenen bzw. deren Epitopen zählen Moleküle, die aus sämtlichen Proteinklassen stammen können (z. B. Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Enzyme; zur Übersicht siehe Rammensee et al., 1995; Robbins und Kawakami, 1996). Diese Proteine müssen nicht notwendigerweise an der Zelloberfläche lokalisiert sein, wie dies bei der Erkennung durch Antikörper erforderlich ist. Um für die Erkennung durch CTLs als tumorspezifisches Antigen zu fungieren bzw. um für die Therapie eingesetzt zu werden, müssen die Proteine bestimmte Bedingungen erfüllen: erstens soll das Antigen hauptsächlich von Tumorzellen exprimiert werden und in sog. "kritischen" Normalgeweben nicht oder nur in geringerer Konzentration als in Tumoren vorkommen. Kritische Normalgewebe sind essentielle Gewebe; eine gegen sie gerichtete Immunreaktion könnte unter Umständen schwerwiegende, zum Teil lethale Folgen haben. Zweitens soll das Antigen nicht nur im Primärtumor, sondern auch in den Metastasen vorhanden sein. Des weiteren ist es im Hinblick auf eine breite klinische Anwendung des Antigens erstrebenswert, wenn es in mehreren Tumorarten in hoher Konzentration vorhanden ist. Eine weitere Vorbedingung für die Eignung eines TAA als wirksamer Bestandteil einer Vakzine ist das Vorhandensein von T-Zell-Epitopen in der Aminosäuresequenz des Antigens; vom TAA abgeleitete Peptide sollen zu einer in vitro/in vivo T-Zell Antwort führen ("immunogenes" Peptid). Ein

weiteres Selektionskriterium für ein klinisch breit anwendbares immunogenes Peptid ist die Häufigkeit, mit der das Antigen in einer gegebenen Patientenpopulation anzutreffen ist.

Die immunogenen tumorassoziierten Antigene (TAAs), von denen größtenteils bereits gezeigt wurde, daß sie T-Zell Epitope besitzen, lassen sich in mehrere Kategorien einteilen, u. a. virale Proteine, mutierte Proteine, überexprimierte Proteine, durch chromosomale Translokation gebildete Fusionsproteine, Differenzierungsantigene, onkofetale Antigene (Van den Eynde und Brichard, 1995; von den Eynde und von der Bruggen, 1997).

Die Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von TAAs, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Tumervakzine darstellen, beruhen einerseits auf dem Einsatz von in Patienten bereits induzierten CTLs (zelluläre Immunantwort) oder Antikörpern (humorale Immunantwort), oder basieren auf der Erstellung differenzieller Transkriptionsprofile zwischen Tumoren und Normalgeweben. Im ersten Fall, dem immunologischen Ansatz, werden Patienten-CTLs für ein Screening eukaryotischer Tumor-cDNA-Expressionsbibliotheken, die über MHC-I Moleküle die CTL-Epitope präsentieren, eingesetzt (Boon et al., 1994), während mittels hochaffiner Patienten-Antisera prokaryotische cDNA-Expressionsbibliotheken, direkt über eine Immunoblot-Analyse der einzelnen Plaques auf das Vorhandensein von TAAs untersucht werden (Sahin et al., 1995). Eine Kombination von CTL-Reaktivität und proteinchemischen Verfahren stellt die Isolierung von aus MHC-I isolierten Peptiden von Tumorzellen dar, die über Reaktivität mit Patienten-CTLs vorselektioniert wurden. Die Peptide werden aus dem MHC-I Komplex ausgewaschen und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert (Falk et al., 1991; Woelfel et al., 1994; Cox et al., 1994). Die Ansätze, welche CTLs zum Charakterisieren von Antigenen verwenden, sind aufgrund der erforderlichen Kultivierung und Aktivierung von CTLs mit einem erheblichen Aufwand verbunden bzw. nicht immer erfolgreich.

Methoden zur Identifizierung von TAAs, welche auf dem Vergleich des Transkriptionsprofils von Normal- mit Tumorgewebe beruhen, sind vielfältig; dazu zählen die differenzielle Hybridisierung, die Erstellung von Subtraktions-cDNA-Banken ("representational difference analysis"; Hubank und Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) und der Einsatz der DNA-Chip Technologie oder der SAGE-Methode (Velculescu et al., 1995). Im Gegensatz zur oben erwähnten immunologischen Methode mit Hilfe von Patienten-CTLs muß beim Einsatz von molekularbiologischen Methoden gezeigt werden, daß die damit gefundenen potentiellen Antigenkandidaten tumorspezifisch (tumorassoziiert) sind und tatsächlich T-Zell Epitope besitzen, die eine zytotoxische T-Zell Antwort auslösen können. In zumindest einem Fall (NY-ESO/LAGE-1) wurde ein Antigen sowohl durch die Verwendung von Patientensera als auch durch RDA identifiziert (Chen et al., 1997; Lethe et al. 1998), außerdem wurden CTL-Epitope dieses Antigens und eine gleichzeitige spontane humorale und T-Zell Antwort in einem Patienten beschrieben (Jager et al., 1998).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein neues tumorassoziiertes Antigen (TAA) bereitzustellen.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem zunächst mittels RDA ("representational difference analysis") zwischen einem Pool von verschiedenen Plattenepithelkarzinomen der Lunge und einem Pool von 11 verschiedenen Normalgeweben eine cDNA-Subtraktionsbibliothek hergestellt wurde. Zur Generierung der für die subtraktive Hybridisierung notwendigen cDNA-Fragmente von "tester" und "driver" wurde in Abweichung vom ursprünglichen Protokoll (Diatchenko et al., 1996) eine Mischung von 6 verschiedenen Restriktionsenzymen eingesetzt. Die Verwendung einer Mischung verschiedener Restriktionsenzyme, die 6 Basenpaare als Erkennungssequenz benötigen, hat gegenüber dem ursprünglichen Protokoll (Diatchenko et al., 1996) folgende Vorteile: a) durch Auswahl von jeweils zwei Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenzen durch 6-er Kombination der Basen A/T (z. B. Ssp I: AATATT) oder C/G (z. B. Nae I: GCCGGC) oder A/C/G/T (z. B. EcoR V: GATATC) dargestellt sind, werden sowohl GC- als auch AT-reiche Regionen eines Gens gleichermaßen geschnitten, wodurch eine homogene Repräsentanz der gesamten Genregion als Restriktionsfragmente ermöglicht wird; b) weiters ist es dadurch möglich, im statistischen Mittel größere cDNA-Fragmente des Kandidatengens zu erhalten (ca. 800 bp), was wiederum bei der nachfolgenden Analyse (Sequenzierung und Annotation) und der Klonierung der "full-size" cDNA von großem Vorteil ist. Im Originalprotokoll (Diatchenko et al., 1996) wurde ein nur 4-Basen erkennendes Restriktionsenzym (Rsa I) eingesetzt, das zu einer mittleren Fragmentlänge von 256 bp führt und spezifisch CG- oder AT-reiche Regionen nicht prozessieren kann. Um der durch die längeren Insert-cDNA-Fragmente veränderten Hybridisierungskinetik gerecht zu werden, wurde das PCR-Protokoll wie im Beispiel 1 beschrieben geändert.

Zur Selektion der im Tumor überexprimierten Antigene wurden zunächst die erhaltenen cDNA-Klone vereinzelt und davon jeweils eine Glycerinstammkultur, eine Plasmidpräparation und eine das Insert darstellende Sammlung der PCR-Fragmente im 96-Loch-Plattenformat etabliert. Die cDNA-Fragmente der 4748 Klone der subtraktiven Plattenepithelkarzinom cDNA-Bibliothek der Lunge wurden in Triplika auf Filter aufgebracht und jeweils mit einer testis-spezifischen cDNA Bibliothek, einer Mischung von cDNAs aus 15 Normalgeweben bzw. von gepoolten Proben von Tumorpatienten (Plattenepithelkarzinom der Lunge) hybridisiert, um spezifische Tumorantigene oder Antigene vom Tumor/Testis-Typ zu selektionieren. Jene 234 Klone, die nur mit der testis-spezifischen bzw. der tumor-spezifischen oder mit beiden Hybridisierungsproben, nicht aber mit der Normalgewebe-Hybridisierungsprobe ein Signal ergaben, wurden zur weiteren Analyse ausgewählt. Nach Sequenzierung und Annotation mit in Datenbanken verfügbaren Sequenzen wurden 36 unbekannte Gene, zu denen zum Teil ESTs ("expressed sequence tags") Einträge in der Datenbank existierten, erhalten. Von diesen Genen wurden jene 10 näher untersucht, deren ESTs nicht aus kritischen Normalgeweben stammen. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde festgestellt, daß ein Klon (C42) eine deutliche Überexpression in Tumor und Testis, nicht jedoch in anderen untersuchten Normalgeweben zeigte. Eine anschließend durchgeführte Northern Blot Analyse in verschiedenen Normal- und Tumorgeweben bestätigte, daß C42 in den untersuchten Normalgeweben – mit Ausnahme einer schwachen Bande in Esophagus – keine Transkription aufwies, jedoch im Plattenepithelkarzinom der Lunge und des Esophagus ein starkes Signal zu erkennen war. Weiters ist aus den Northern Blot Experimenten gewonnenen Daten zu schließen, daß das C42-Transkript eine Länge von ca. 4,4 kb hat.

Die humane C42-cDNA wurde kloniert, die erhaltene Sequenz ist in SEQ ID NO:1 dargestellt. Die Sequenz von C42 zeigt sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene eine eindeutige Homologie zu einer Genfamilie von Ca^{2+} -aktivierbaren Cl^- -Kanalproteinen, die in verschiedenen Spezies (teilweise sehr gewebsspezifisch) exprimiert werden. 5 Vertreter dieser Familie wurden bislang kloniert und partiell charakterisiert; die beiden Rindergene bCLCA1 ("bovine Ca^{2+} -acti-

vated Cl⁻ channel-1"; Cunningham et al., 1995) und Lu-ECAM-1 ("bovine lung-endothelial cell adhesion molecule-1"; Eible et al., 1997), das Mausgen mCLCA1 ("murine Ca²⁺-activated Cl⁻ channel-1; Gandhi, et al., 1998) und zwei humane Gene hCLCA1 ("human Ca²⁺-activated Cl⁻ channel-1; Gruber et al., 1998) und hCLCA3 ("human Ca²⁺-activated Cl⁻ channel-3; Gruber et al., 1999). Alle Vertreter dieser Proteinfamilie weisen typische Transmembranbereiche auf und werden nach dem derzeitigen Wissensstand posttranslational gespalten, um Heterodimere zu bilden, wobei der C-terminale Teil glycosyliert wird (Eible et al., 1997) mit Ausnahme des hCLCA3, das eine verkürzte Form darstellt (Gruber et al., 1999). Das hCLCA1 Gen wurde ausschließlich in Epithelzellen der Trachea des Rindes nachgewiesen. Das eng verwandte, ebenfalls aus dem Rind isolierte Lu-ECAM-1, ist gewebsspezifisch in den vaskulären Endothelzellen der pulmonaren Venen exprimiert. Zhu et al. (1992) wiesen nach, daß Lu-ECAM-1 die Bindung der B16F10-Lungenmetastasen des Maus-Melanoms an Endothelzellen ermöglicht.

Bei C42 handelt es sich um einen neuen humanen Vertreter dieser Proteinfamilie.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung erhaltene 3'-C42-cDNA weist einen für 742 Aminosäuren kodierenden durchgehenden Leserahmen auf, der den C-terminalen Abschnitt von C42 repräsentiert. Die C-42-Sequenz weist die für die Proteinfamilie typische hydrophobe Transmembranregionen auf (Positions Nr. 136-160, 232-252, 320-340 und 427-450 in SEQ ID: 2) besitzt aber zum Unterschied zu den anderen Vertretern einen C-Terminus, der von stark geladenen Aminosäuren aufgebaut wird.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung klonierte C42-cDNA beträgt 2454 bp, wobei das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA in diesem Bereich spricht.

Informationen über das 5'-Ende und die weiter stromaufwärts liegende Sequenz der für C42 kodierenden DNA können durch molekularbiologische Standardmethoden gewonnen werden, z. B. mittels 5-RACE ("rapid amplification of cDNA ends"). Bei dieser Methode wird RNA, vorzugsweise mRNA, aus Zellen oder Geweben, in denen C42 transkribiert wird (z. B. Mammakarzinom-, Lungenkarzinom (SCC)- oder Ösophagustumor-Gewebe) revers transkribiert und anschließend mit einem Adaptor bekannter Sequenz ligiert. Eine PCR mit einem Adaptorprimer (bindet spezifisch an den Adaptor am 5'-Ende der cDNA) und einem C42-spezifischen Primer (z. B. SEQ ID NO:18) erlaubt die Amplifikation entsprechender C42-Fragmente. Diese PCR-Produkte können, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach Standardmethoden kloniert und, insbesondere durch DNA Sequenzierung, charakterisiert werden.

Eine alternative Methode zur Charakterisierung des 5'-Endes ist das Screenen von cDNA-Bibliotheken durch Hybridisierung mit für C42 spezifischen DNA-Sonden oder die Analyse von cDNA-Expressions Bibliotheken mit Antisera.

Führt das Screenen von cDNA-Bibliotheken aufgrund methodisch bedingter Beschränkungen, z. B. ineffiziente reverse Transkription, bedingt durch ausgeprägte Sekundärstrukturen der RNA, nicht zum gewünschten Ziel, können genomische Bibliotheken untersucht werden, indem z. B., wie beim Screenen von cDNA-Bibliotheken, durch Hybridisierung mit für C42 spezifischen DNA-Sonden Klone isoliert werden können, die die stromaufwärts vom erhaltenen 5'-Ende der cDNA liegende Sequenzinformation z. B. die Promotorregion von C42 enthalten.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte cDNA weist die in SEQ ID NO:1 angegebene Nukleotidsequenz auf, sie kodiert für den C-terminalen Abschnitt des tumorassoziierten Antigens (TAA) der Bezeichnung C42.

Ein von der isolierten cDNA mit diesem in Richtung 5'-Ende offenen durchgehenden Leserahmen exprimiertes Protein weist die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz auf.

Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt ein tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung C42, das die in SEQ ID NO:2 angegebene Aminosäuresequenz als Teilsequenz enthält.

Die in SEQ ID NO:2 angegebene Sequenz stellt den C-terminalen Abschnitt eines Proteins dar, das von einem ca. 4,4 kb großen Transkript translatiert ist, bzw. das von einem Transkript einer Größe von ca. 3,5 kb translatiert ist, das von einer Spleißvariante des 4,4 kb Transkripts oder von einem Transkript eines dazu homologen Gens abgeleitet ist.

Die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz kann Abweichungen aufweisen, z. B. solche, die durch Austausch von Aminosäuren bedingt sind, sofern das C42-Derivat die für die Anwendung in einer Tumorstoffvakzine erwünschten immunogenen Eigenschaften aufweist.

Die natürliche Aminosäuresequenz von C42 kann gegebenenfalls modifiziert sein, indem einzelne Aminosäuren in einem C42 CTL-Epitop ausgetauscht werden, um, im Vergleich zum natürlichen C42 CTL-Epitop, eine Steigerung der Affinität von C42-Peptiden zu MHC-I-Molekülen und damit eine erhöhte Immunogenität und letztlich eine verstärkte Reaktivität gegenüber Tumoren zu bewirken. Modifikationen im Bereich der C42-Epitope können am C42-Gesamtprotein (dieses wird von den APCs zu den entsprechenden Peptiden prozessiert) bzw. an größeren C42-Proteinfragmenten oder an C42-Peptiden (vgl. unten) vorgenommen werden. In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung immunogene Fragmente und Peptide, die von C42 abgeleitet sind. Letztere werden im folgenden als "C42-Peptide" bezeichnet. Eine erste Gruppe sind C42-Peptide, die eine humorale Immunantwort (Induktion von Antikörpern) auslösen. Derartige Peptide sind ausgewählte Abschnitte von C42 (mindestens 12 bis 15 Aminosäuren), die mittels sogenannter Vorhersage-Algorithmen ("prediction algorithms") wie z. B. dem "surface probability blot" (Emini et al., 1985), dem "hydrophobicity blot" (Kyte and Doolittle, 1982) und dem "antigenic index" (Jameson and Wolf, 1988) ermittelt werden können.

Miteingeschlossen sind auch all jene Peptide, die aus dem noch zu klonierenden N-terminalen Bereich von C42 abgeleitet werden können bzw. jene Peptidepitope, die zu einer immunologischen Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebe beitragen. Unter der Voraussetzung, daß es sich bei den Unterschieden in der Aminosäuresequenz um eine tumorspezifische Mutationen handelt, ist nämlich zu erwarten, daß Peptide aus diesem Bereich eine verstärkte Immunogenität im Vergleich zu Peptiden aus einem aus Normalgewebe isolierten C42-Gen aufweisen. Um zu bestätigen, daß etwaige Mutationen die tumorspezifisch sind, können Antikörper gegen diese Bereiche generiert und Tumorzellen auf Expression von möglichen Mutationen untersucht werden.

C42-Peptide werden direkt oder in modifizierter Form (z. B. an KLH = "keyhole limpet hemocyanine" gekoppelt) verabreicht und die Bildung von Antikörpern mittels gängiger immunologischer Assays, z. B. mittels ELISA, bestimmt.

Weitere, im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugte, C42-Peptide sind diejenigen, die durch MHC-Moleküle präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort bewirken. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, nämlich MHC-I-Moleküle, die von CD8-positiven CTLs und MHC-II-Moleküle, die von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt

werden.

Damit ein Peptid eine zelluläre Immunantwort auslöst, muß es an ein MHC-Molekül binden, wobei der zu behandelnde Patient das MHC-Molekül in seinem Repertoire aufweisen muß. Die Bestimmung des MHC-Subtyps des Patienten stellt somit, im Hinblick auf die Auslösung einer zellulären Immunantwort, eine der wesentlichen Voraussetzungen für die wirksame Anwendung eines Peptids an diesem Patienten dar.

Die Sequenz eines therapeutisch einzusetzenden C42-Peptids wird durch das jeweilige MHC-Molekül hinsichtlich Ankeraminoacids und Länge vorgegeben. Definierte Ankerpositionen und Länge gewährleisten, daß ein Peptid in die Peptid-Bindungsfurche des jeweiligen MHC-Moleküls des Patienten paßt. Dies hat zur Folge, daß das Immunsystem stimuliert wird und eine zelluläre Immunreaktion erzeugt wird, die sich, im Falle der Verwendung eines von einem Tumorentigen abgeleiteten Peptids, gegen die Tumorzellen des Patienten richtet.

Immunogene C42-Peptide können nach bekannten Methoden identifiziert werden, eine der Grundlagen dafür ist die Beziehung zwischen MHC-Bindung und CTL-Induktion.

Da also die Sequenz immunogener Peptide aufgrund ihres Peptidbindungsmotivs vorherbestimmbar ist, können C42-Peptide, die CTL-Epitope darstellen, aufgrund der C42-Proteinsequenz identifiziert und synthetisiert werden. Dazu sind verschiedene Methoden geeignet, die zur Identifizierung von CTL-Epitopen von bekannten Protein-Antigenen verwendet wurden; z. B. die von Stauss et al., 1992, für die Identifizierung von T-zell-Epitopen in humanem Papillomavirus beschriebene Methode.

Die allelspezifischen Anforderungen jedes MHC-I Allel-Produkts an ein Peptid, das an das MHC-Molekül bindet und von diesem präsentiert wird, wurden als Motiv zusammengefaßt (z. B. Falk et al., 1991). Bisher ist eine große Anzahl sowohl von MHC-Peptid-Motiven als auch von MHC-Liganden bekannt. Eine im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Suche nach Epitopen eines bekannten Proteins, das in ein bestimmtes MHC-I-Molekül paßt, wurde in einem Übersichtsartikel von Rammensee et al., 1995, beschrieben. Sie umfaßt die folgenden Schritte: zunächst wird die Protein-Sequenz auf Abschnitte untersucht, die dem Anker-Motiv entsprechen, wobei gewisse Variationen hinsichtlich Peptidlänge und Ankerbesetzung möglich sind. Wenn z. B. ein Motiv ein 9-mer mit Ile oder Leu am Ende vorschreibt, können auch 10-mer mit einem entsprechenden C-Terminus in Betracht gezogen werden, ebenso Peptide mit anderen aliphatischen Resten, wie Val oder Met am C-Terminus. Auf diese Weise wird eine Reihe von Peptid-Kandidaten erhalten. Diese werden auf das Vorhandensein möglichst vieler Ankerreste, die sie gemeinsam mit bereits bekannten Liganden haben, untersucht und/oder daraufhin, ob sie für verschiedene MHC-Moleküle "bevorzugte" Reste haben (entsprechend der Tabelle von Rammensee et al., 1995). Um schwach bindende Peptide auszuschließen, werden zweckmäßig Bindungs-Assays durchgeführt. Wenn die Anforderungen an die Peptid-Bindung für bestimmte MHC-Moleküle bekannt sind, können die Peptid-Kandidaten auch auf Nicht-Ankerreste untersucht werden, die sich negativ oder positiv auf die Bindung auswirken, oder die diese erst ermöglichen (Ruppert et al., 1993). Bei dieser Vorgangsweise ist jedoch in Betracht zu ziehen, daß das Peptid-Bindungs-Motiv für die Suche nach natürlichen Liganden nicht allein ausschlaggebend ist; auch andere Aspekte, z. B. die Enzymspezifität während der Antigenprozessierung, tragen – zusätzlich zur Spezifität der MHC-Bindung – zur Identität des Liganden bei. Eine Methode, die diese Aspekte berücksichtigt, und die im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Identifizierung von immunogenen C42-Peptiden geeignet ist, wurde u. a. von Kawakami et al., 1995, angewendet, um auf der Grundlage bekannter HLA-A*0201 Motive gp100 Epitope zu identifizieren.

Die Peptide können auch im Hinblick auf ihre Bindungsfähigkeit an MHC-II-Moleküle ausgewählt werden. Das MHC-II-Bindungsmotiv, das sich über neun Aminosäuren erstreckt, weist einen höheren Grad an Degeneration in den Ankerpositionen auf als das MHC-I-Bindungsmotiv. Es wurden kürzlich, ausgehend von der Röntgenstrukturanalyse von MHC-II-Molekülen, Methoden entwickelt, die die genaue Analyse der MHC-II-Bindungsmotive, und ausgehend davon, Variationen der Peptidsequenz erlauben (Rammensee et al., 1995, und die dort zitierte Originalliteratur). Peptide, die an MHC-II-Moleküle binden, werden den CD4-T-Zellen typischerweise von dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen präsentiert. Die CD4-T-Zellen wiederum aktivieren dann in der Folge direkt CTLs durch z. B. Cytokin-Ausschüttung und Verstärken die Effizienz der Antigen-Präsentation durch APC (dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen).

Seit kurzem sind Datenbanken und Vorhersage-Algorithmen verfügbar, die mit großer Verlässlichkeit die Vorhersage von Peptid-Epitopen erlauben, die an ein bestimmtes MHC-Molekül binden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden, unter Verwendung des von Parker et al., 1994 und Rammensee et al., 1995 beschriebenen Algorithmus, für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1, -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, Kandidaten-Peptide des C-terminalen Fragments von C42 identifiziert, von denen zu erwarten ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die ermittelten Peptide sind in Tabelle 1 aufgelistet. Auf ähnliche Weise können, gegebenenfalls unter Verwendung weiterer Algorithmen, die den unterschiedlichen Charakteristika der Peptide (Hydrophobizität, Ladung, Größe) bzw. Anforderungen an die Peptide, z. B. die 3D-Struktur des HLA-Moleküls, Rechnung tragen, weitere potentielle Peptid-Epitope ermittelt werden; dies gilt auch für Peptid-Epitope anderer HLA-Typen.

Nach Auswahl von C42-Peptid-Kandidaten mit Hilfe der angeführten Methoden wird deren MHC-Bindung mittels Peptidbindungs-Assays getestet. Als nächstes wird die Immunogenität der Peptide mit guten Bindungseigenschaften bestimmt (Stabilität der Peptid-MHC-Wechselwirkung korreliert in den meisten Fällen mit Immunogenität; von der Burg et al., 1996). Um die Immunogenität des ausgewählten Peptids oder Peptid-Äquivalents zu bestimmen, können Methoden, wie z. B. von Sette et al., 1994, beschrieben, in Kombination mit quantitativen MHC-Bindungs-Assays verwendet werden. Alternativ kann die Immunogenität des ausgewählten Peptids über in vitro CTL-Induktion mittels bekannter Methoden (wie weiter unten für ex vivo CTL-Induktion beschrieben) getestet werden. Das Prinzip der in mehreren Schritten durchgeführten Methode für die Auswahl von Peptiden, die zur Auslösung einer zellulären Immunantwort fähig sind, ist in der WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, beschrieben. Eine allgemeine Strategie zum Erhalt effizienter immunogener Peptide, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wurde außerdem von Schweighoffer, 1997, beschrieben.

Statt die Originalpeptide zu verwenden, die in die Bindungsfurche von MHC-I- oder MHC-II-Molekülen passen, also

Peptide, die unverändert von C42 abgeleitet sind, können anhand der auf der Grundlage der Originalpeptidsequenz angegebenen Minimalanforderungen bezüglich Ankerpositionen und Länge Variationen vorgenommen werden, sofern durch diese Variationen die effektive Immunogenität des Peptids, die sich zusammensetzt aus seiner Bindungsaffinität an das MHC-Molekül und seiner Fähigkeit, T-Zell-Rezeptoren zu stimulieren, nicht nur nicht beeinträchtigt ist, sondern vorzugsweise verstärkt wird. In diesem Fall werden also künstliche Peptide oder Peptid-Äquivalente verwendet, die entsprechend den Anforderungen der Bindungsfähigkeit an ein MHC-Molekül entworfen sind.

Solchermaßen veränderte Peptide werden als "heteroclitische Peptide" bezeichnet. Sie können nach folgenden Methoden erhalten werden:

Zunächst werden die Epitope von MHC-I- bzw. MHC-II-Liganden bzw. deren Variation z. B. nach dem von Rammen-see et al., 1995, beschriebenen Prinzip vorgenommen. Die Länge des Peptids entspricht im Falle seiner Abstimmung auf MHC-I Moleküle vorzugsweise einer Minimalsequenz von 8 bis 10 Aminosäuren mit den erforderlichen Ankeramino-säuren.

Gegebenenfalls kann das Peptid auch am C- und/oder am N-Terminus verlängert sein, sofern diese Verlängerung die Bindungsfähigkeit an das MHC-Molekül nicht beeinträchtigt bzw. das verlängerte Peptid auf die Minimalsequenz zellulär prozessiert werden kann.

Die modifizierten Peptide werden daraufhin auf ihre Erkennung durch TTLs ("tumor-infiltrating lymphocytes"), auf CTL-Induktion sowie auf verstärkte MHC-Bindung und Immunogenität geprüft, wie von Parkhurst et al., 1996, und Becker et al., 1997, beschrieben.

Eine weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Auffindung von Peptiden mit stärkerer Immunogenität als die der natürlichen C42-Peptide besteht im Screenen von Peptid-Bibliotheken mit CTLs, die die natürlich auf Tumoren vorkommenden C42-Peptide erkennen, wie von Blake et al., 1996, beschrieben; in diesem Zusammenhang wird die Verwendung kombinatorischer Peptid-Bibliotheken vorgeschlagen, um Moleküle zu entwerfen, welche von MHC-I-restringierten CTLs erkannte Tumorepitope nachahmen.

Das C42-Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder davon abgeleitete immunogene Fragmente oder Peptide können rekombinant oder mittels Peptid-Synthese hergestellt werden, wie in der WO 96/10413 beschrieben, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Für die rekombinante Herstellung wird das entsprechende DNA-Molekül nach Standardmethoden in einen Expressionsvektor eingefügt, in eine geeignete Wirtszelle transfiziert, der Wirt unter geeigneten Expressionsbedingungen kultiviert und das Protein gereinigt. Für die chemische Synthese von C42-Peptiden können herkömmliche Methoden verwendet werden, z. B. im Handel erhältliche automatische Peptid-Synthesizer.

Alternativ zu natürlichen C42-Peptiden oder heteroclitischen Peptiden können Substanzen, die solche Peptide vortäuschen, z. B. "Peptidomimetika" oder "retroinverse-Peptide", verwendet werden. Zur Testung dieser Moleküle im Hinblick auf die therapeutische Verwendbarkeit in einer Tumorstoffvakzine werden dieselben Methoden angewendet wie oben für die natürlichen C42-Peptide oder C42-Peptidäquivalente.

Das TAA der Bezeichnung C42 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von C42-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Lungen-, Mamma- und Esophaguskarzinom.

Die Immunantwort in Form einer Induktion von CTLs kann in vivo oder ex vivo bewirkt werden.

Für die in vivo Induktion von CTLs wird eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als wirksame Komponente das TAA C42 bzw. davon abgeleitete Fragmente oder Peptid(e), einem Patienten verabreicht, der an einer mit dem TAA assoziierten Tumorerkrankung leidet, wobei die Menge an TAA(Peptid) ausreichen muß, um eine wirksame CTL-Antwort auf den Antigen-tragenden Tumor zu erzielen.

Die Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt eine pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, toxische, orale oder lokale Verabreichung. Vorzugsweise dient die Zusammensetzung der parenteralen Verabreichung, z. B. für die subkutane, intradermale oder intramuskuläre Anwendung. Die C42-TAA/Peptide sind in einem pharmazeutisch annehmbaren, vorzugsweise wässrigen, Träger gelöst oder suspendiert. Die Zusammensetzung kann außerdem übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, etc. enthalten. Die C42-TAA/Peptide können allein oder in Kombination mit Adjuvantien, z. B. inkomplettem Freund's Adjuvans, Saponinen, Aluminiumsalzen oder, in einer bevorzugten Ausführungsform, Polykationen wie Polyarginin oder Polylysin, verwendet werden. Die Peptide können auch an Komponenten, die die CTL-Induktion oder CTL-Aktivierung unterstützen, gebunden werden, z. B. an T-Helferpeptide, Lipide oder Liposomen, oder sie werden gemeinsam mit diesen Substanzen und/oder gemeinsam mit immunstimulierenden Substanzen, z. B. Zytokinen (IL-2, IFN- γ) verabreicht. Methoden und Formulierungen, die zur Herstellung und Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet sind, sind in der WO 95/04542 und WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird, beschrieben.

C42-Fragmente bzw. C42-Peptide können auch verwendet werden, um eine CTL-Antwort ex vivo auszulösen. Eine ex vivo CTL-Antwort auf einen Tumor, der C42 exprimiert, wird induziert, indem man die CTL-Vorläuferzellen zusammen mit APCs und C42-Peptiden bzw. C42-Protein inkubiert. Dann läßt man die aktivierten CTLs expandieren, worauf sie dem Patienten wieder verabreicht werden. Alternativ können APCs mit C42-Peptiden beladen werden, was zu einer effizienten Aktivierung zellulärer Immunreaktionen gegen C42 positive Tumoren führen kann (Mayordomo et al., 1995; Zitvogel et al., 1996). Eine geeignete Methode um Peptide auf Zellen, z. B. dendritische Zellen, zu laden, wird in der WO 97/19169 offenbart.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine Kombination mehrerer verschiedener C42-Peptide oder C42-Peptidäquivalente angewendet. In einer weiteren Ausführungsform werden C42-Peptide mit von anderen TAAs abgeleiteten Peptiden kombiniert. Die Auswahl von Peptiden für derartige Kombinationen wird im Hinblick auf die Erfassung unterschiedlicher MHC-Typen getroffen, um eine möglichst breite Patientenpopulation abzudecken, und/oder sie wird auf ein möglichst breites Indikationsspektrum abgestellt, indem Peptide mehrerer unterschiedlicher Tumorentigene kombiniert werden. Die Anzahl der Peptide in einer pharmazeutischen Zusammensetzung kann über einen weiten Bereich schwan-

ken, typischerweise enthält eine klinisch anwendbare Vakzine 1 bis 15, vorzugsweise 3 bis 10 verschiedene Peptide.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch als diagnostische Reagentien eingesetzt werden.

Beispielsweise können die Peptide dazu benutzt werden, um das Ansprechen eines Patienten auf die durch das immunogene Peptid hervorgerufene humorale oder zelluläre Immunantwort zu testen. Dadurch besteht die Möglichkeit, ein Behandlungsprotokoll zu verbessern. Beispielsweise kann in Abhängigkeit der Darreichungsform (Peptid, Gesamtprotein oder DNA-Vakzine) des TAA die Zunahme von Vorläufer T-Zellen in den PBLs, die eine Reaktivität gegen das definierte Peptidepitop aufweisen, untersucht werden (Robbins und Kawakami, 1996 sowie darin zitierte Referenzen). Außerdem können die Peptide oder das Gesamtprotein bzw. gegen das TAA gerichtete Antikörper dazu verwendet werden, um das Risiko eines Patienten an einem C42-assoziierten Tumor zu erkranken, vorherzusagen bzw. den Krankheitsverlauf eines C42-positiven Tumors zu charakterisieren (z. B. durch immunhistochemische Analysen von Primärtumor und Metastasen). Eine derartige Strategie hat sich schon mehrfach als erfolgreich erwiesen, z. B. der Nachweis des Östrogenrezeptors als Entscheidungsgrundlage zur Endokrintherapie bei Brustkrebs; c-erbB-2 als relevanter Marker bei Prognostik und Therapieverlauf bei Brustkrebs (Ravaioli et al., 1998; Revillion et al., 1998); PSMA ("prostate specific membrane antigen") als Marker für Epithelialzellen des Prostatakarzinoms im Serum bzw. durch Einsatz eines ¹¹¹In-markierten monoklonalen Antikörpers gegen PSMA bei der Immunoscintigraphie auf Prostatakarzinom (Murphy et al., 1998 und inkludierte Referenzen); CEA ("carcinoembryonic antigen") als serologischer Marker für die Prognose und Verlauf bei Patienten des kolorektalen Karzinoms (Jessup und Loda, 1998).

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt isolierte DNA-Moleküle, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften von C42 oder für Fragmente davon.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, das ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz enthält oder das ein Polynukleotid enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Das erfindungsgemäße DNA-Molekül bzw. Fragmente davon kodieren für (Poly)peptide der Bezeichnung C42, enthaltend die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz, bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide; damit sind DNA Moleküle mitumfaßt, die durch die Degeneration des genetischen Codes Abweichungen von der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz aufweisen.

Die Erfindung betrifft auch DNA-Moleküle, die durch Mutation zu einem Austausch von Aminosäuren in der in SEQ ID NO:2 dargestellten Proteinsequenz führen, sofern sie für ein C42-Derivat bzw. Fragmente oder Peptide mit den für die Anwendung als Tumorstoffe erwünschten immunogenen Eigenschaften kodieren.

Die C42-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung oder die entsprechenden RNAs, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, werden, wie die davon kodierten (Poly)Peptide, für die Immuntherapie von Krebserkrankungen eingesetzt.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden DNA-Moleküle, kodierend für natürliche C42-Polypeptide verwendet. Alternativ zur natürlichen C42-cDNA bzw. Fragmenten davon können modifizierte Derivate verwendet werden. Diese umfassen Sequenzen mit Modifikationen, die für ein Protein(fragment) bzw. Peptide mit stärkerer Immunogenität kodieren, wobei für die Modifikationen auf DNA-Ebene dieselben Überlegungen gelten wie für die oben beschriebenen Peptide. Eine weitere Art der Modifikation ist die Aneinanderreihung zahlreicher Sequenzen, kodierend für immunologisch relevante Peptide, nach Art einer Perlschnur ("string-of-beads"; Toes et al., 1997). Die Sequenzen können auch durch Anfügung von Hilfselementen modifiziert werden, z. B. Funktionen, die eine effizientere Abgabe und Prozessierung des Immunogens gewährleisten (Wu et al., 1995). Beispielsweise kann durch Anfügen einer Lokalisierungssequenz in das endoplasmatische Retikulum ("ER targeting sequence") die Prozessierung und damit die Präsentation und letztlich die Immunogenität des Antigens erhöht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein rekombinantes DNA-Molekül, das die C42-DNA enthält.

Die C42-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung können, vorzugsweise in rekombinanter Form als Plasmide, direkt oder als Bestandteil eines rekombinanten Virus, oder Bakteriums verabreicht werden. Prinzipiell kann jede gentherapeutische Methode für die Immuntherapie von Krebs auf Basis von DNA ("DNA-Vakzine") auf C42-DNA angewendet werden, und zwar sowohl in vivo als auch ex vivo.

Beispiele für die in vivo Verabreichung sind die direkte Injektion von "nackter" DNA, entweder intramuskulär oder mittels Gen-Pistole ("gene gun") von der sich gezeigt hat, daß sie zur Bildung von CTLs gegen Tumorantigene führt. Beispiele für rekombinante Organismen sind Vaccinia Virus, Adenovirus oder Listeria monocytogenes (eine Übersicht wurde von Coulie, 1997, gegeben). Desweiteren können synthetische Träger für Nukleinsäuren, wie kationische Lipide, Mikrosphären, Mikrokügelchen oder Liposomen für die in vivo Verabreichung von Nukleinsäure-Molekülen, kodierend für C42-Peptid verwendet werden. Ähnlich wie für Peptide können verschiedene Hilfsstoffe, die die Immunantwort verstärken, mitverabreicht werden, z. B. Zytokine, entweder in Form von Proteinen oder dafür kodierenden Plasmiden. Die Applikation kann gegebenenfalls mit physikalischen Methoden, z. B. Elektroporation, kombiniert werden.

Ein Beispiel für die ex vivo Verabreichung ist die Transfektion dendritischer Zellen, wie von Tuting, 1997, beschrieben, oder anderer APCs, die als zelluläre Krebsvakzine zur Anwendung kommen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt die Verwendung von Zellen, die C42 exprimieren, entweder von sich aus oder, in gegebenenfalls modifizierter Form, nach Transfektion mit der entsprechend kodierenden Sequenz, für die Herstellung einer Krebsvakzine.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Antikörper gegen C42 bzw. Fragmente davon. Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch Immunisierung von Tieren, insbesondere Kaninchen, mittels Injektion des Antigens bzw. Fragmenten davon, und anschließender Reinigung des Immunglobulins erhalten werden.

Monoklonale anti-C42-Antikörper können nach Standardprotokollen gemäß dem von Köhler und Milstein, 1975, beschriebenen Prinzip gewonnen werden, indem Tiere, insbesondere Mäuse, immunisiert, anschließend antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Tiere immortalisiert werden, z. B. durch Fusion mit Myelomzellen, und der Überstand der erhaltenen Hybridome mittels immunologischer Standard-Assays auf monoklonale anti-C42-Antikörper gescreent

wird. Für den therapeutischen oder diagnostischen Einsatz im Menschen können diese tierischen Antikörper gegebenenfalls auf herkömmliche Weise chimisiert (Neuberger et al., 1984, Boulianne et al., 1984) oder humanisiert (Riechmann et al., 1988, Graziano et al., 1995) werden.

Humane monoklonale anti-C42-Antikörperfragmente) können auch von sog. "Phage Display Libraries" (Winter et al., 1994, Griffiths et al., 1994, Kruif et al., 1995, Mc Guinness et al., 1996) und mittels transgener Tiere (Brüggemann et al., 1996, Jakobovits et al., 1995) gewonnen werden.

Die erfindungsgemäßen anti-C42-Antikörper können in immunhistochemischen Analysen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von C42-spezifischen Antikörpern, um beliebige Substanzen selektiv zu bzw. in einen Tumor zu bringen, der C42 exprimiert. Beispiele für solche Substanzen sind zytotoxische Agentien oder radioaktive Nuklide, deren Wirkung darin besteht, den Tumor vorort zu schädigen. Aufgrund der tumorspezifischen Expression von C42 sind dabei keine oder nur geringe Nebenwirkungen zu erwarten. In einem weiteren Aspekt können mit Hilfe von C42-Antikörpern Substanzen zur Sichtbarmachung von Tumoren, die C42 exprimieren, herangezogen werden. Dies ist für die Diagnose und die Bewertung des Therapieverlaufs von Nutzen.

Therapeutische und diagnostische Anwendungen von Antikörpern, die für anti-C42-Antikörper in Frage kommen, sind in der WO 95/33771 beschrieben.

Das TAA der Bezeichnung C42 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von C42-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Lungen-, Mamma- und Ösophaguskarzinom.

Figurenübersicht

Fig. 1: Transkription von C42 in Tumorgewebe und Normalgewebe: Semiquantitative RT-PCR von RNA aus verschiedenen Geweben

Fig. 2: Northern Blot Analyse von C42 in Tumor- und Normalgeweben

Beispiel 1

Repräsentative Differenzanalyse ("Representational Difference Analysis"; RDA) eines Pools verschiedener Plattenepithelkarzinomen der Lunge gegenüber einem Pool von 11 Normalgeweben

Biopsien von verschiedenen humanen Lungenkarzinomen vom Typ SCC ("Squamous Cell Carcinoma", Plattenepithelkarzinom) wurden sofort nach der chirurgischen Entfernung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° gelagert. Für die Isolierung von RNA wurden serielle 20 μ m Schnitte bei -20° in einem Kryomikrotom (Jung CM1800, Leica) angefertigt und direkt in 4 M Guanidiniumthiocyanat/1% β -mercaptoethanol aufgelöst, um die RNA zu isolieren. Diese Proben wurden einer Ultrazentrifugation über einen CsCl-Gradienten unterworfen (Sambrook, 1989).

Einige repräsentative Gewebsschnitte (5 μ m) wurden zur histologischen Befundung auf einem Objektträger fixiert und mit Harris' Hematoxyline (Sigma) und Eosin gefärbt. Dies diente dazu, um möglichst homogenes Tumorgewebe als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der RNA bereitzustellen. Nur Proben, die als SCC klassifiziert wurden, wurden weiter bearbeitet.

Von 110 μ g total-RNA aus 5 verschiedenen Plattenepithelkarzinomen der Lunge stammend wurde die poly-A(+)RNA mittels des PolyAtract Kit (Promega) nach Vorschrift des Herstellers isoliert (SCC-Pool). Ausgehend von diesem SCC-Pool und einem Pool aus 2,5 μ g poly-A(+) RNA von 11 Normalgeweben (Clontech) Knochenmark, Herz, Niere, Leber, Lunge, Pankreas, Skelettmuskel, Milz, Thymus, Dünndarm und Magen wurde RDA (Diatchenko et al.,; Hubank und Schatz,) unter Verwendung des PCR-selectTM Kit (Clontech, Palo Alto) entsprechend dem Hersteller-Protokoll durchgeführt; dabei wurde RNA vom SCC-Pool ("tester") und vom Normalgewebe ("driver") entsprechend dem Hersteller-Protokoll verwendet. Im Gegensatz zum ursprünglichen Protokoll wurde nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA mittels oligo-dT die cDNA mit 6 Restriktionsenzymen: EcoRV, NaeI, NruI, ScaI (Promega), SspI, StuI (TaKaRa) in Promega Puffer A 2 Stunden bei 37°C und nach Erhöhung der NaCl Konzentration auf 150 mM weitere 2 Stunden bei 37°C geschnitten. Der Einsatz dieser Mischung von 6 verschiedenen Restriktionsenzymen erlaubte die Generierung von ca. 800 bp langen cDNA-Fragmenten, die zur repräsentativen Differenzanalyse zum Einsatz kamen.

Gleiche Teile von "tester-cDNA" wurden entweder mit den Adaptoren A oder B ligiert und anschließend getrennt mit einem Überschuß an "driver-cDNA" bei 68°C hybridisiert. Danach wurden die beiden Ansätze vereinigt und einer zweiten Hybridisierung mit frischer denaturierter "driver-cDNA" unterworfen. Die angereicherten "tester"-spezifischen cDNAs wurden anschließend durch PCR mit für die Adaptoren A bzw. B spezifischen Primern des Kits mit 2 Minuten Elongationszeit bei 72°C exponentiell amplifiziert, 27 Zyklen (10" 94°C , 30" 66°C , 2' 72°C). Für eine weitere Anreicherung wurde ein Aliquot dieser Reaktion einer zweiten PCR mit spezifischen nach innen versetzten ("nested") Primern des Kits mit 2 Minuten Elongationszeit bei 72°C unterworfen, 10 Zyklen (10" 94°C , 30" 66°C , 2' 72°C). Das aus dieser Reaktion resultierende Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen) ligiert und anschließend in kompetente E. coli (OneShotTM, Invitrogen) transfiziert. 4748 Transformanten wurden erhalten und in 96-Napf Blöcken in LB-Amp Medium für 48 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden 5 μ l Aliquots der E. coli Suspensionen in 500 μ l TE Puffer für 10 Minuten auf 100°C erhitzt und 1,5 μ l davon als Vorlage für eine PCR verwendet, bei der das Insert des Vektors mit flankierenden Primern (SEQ ID NO:9 und 10) amplifiziert wurde, 35 Zyklen (1' 94°C , 1' 55°C , 2' 72°C). Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. 17 μ l des jeweiligen PCR-Produktes wurden in einem Endvolumen von 252 μ l 6xSSC aufgenommen und in 3 Replika auf äquilierten Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham) entsprechend den Standardmethoden zur Herstellung von DNA-Dot-Blots immo-

bilisiert (Sambrook, 1989). Die verbleibenden Bakterienkulturen wurden als Glycerinstammkulturen bei -80°C gelagert.

Es wurde eine cDNA-Subtraktionsbibliothek aus 4748 Einzelklonen erhalten, die als E. coli Glycerin-Stammkulturen vorlagen, deren immobilisierte PCR-Produkte auf Nylonmembranen aufgebracht wurden und deren Insertlänge durch die Agarose-Gel-Elektrophorese bekannt war. Dabei konnte, wie erwartet, eine mittlere Länge der inserierten cDNA-Fragmente von ca. 800 bp nachgewiesen werden.

Beispiel 2

Selektion von "Tumor"- und "Tumor-Testis"-Genen durch Differenzielle Hybridisierung der cDNA-Subtraktionsbibliothek

Eine humane Testis-spezifische cDNA Library ("Human Testis-Specific PCR-SelectTM cDNA"; Clontech, Palo Alto) wurde entsprechend den Herstellerangaben mittels 11 Zyklen durch PCR amplifiziert (10° 94°C , 30° 66°C , $1,5^{\circ}$ 72°C). Aliquots wurden mit "RTS RadPrime DNA Labeling System" (GibcoBRL) mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (NEN, Boston) nach Angaben des Herstellers markiert und nach Standardvorschrift (Sambrook, 1989) zur Hybridisierung unter stringenten Bedingungen (68°C) mit den unter Beispiel 1 beschriebenen DNA-Dot-Blots verwendet. Klone, die mit der "Human Testis-Specific PCR-SelectTM cDNA" hybridisieren, wurden mittels Autoradiografie (Xomat DR film, Kodak) visualisiert. Das zweite Set von DNA-Dot-Blots wurde wie oben beschrieben mit einer markierten Sonde eines cDNA SCC-Pools hybridisiert. Das dritte Set von DNA-Dot-Blots wurde in gleicher Weise mit einer Sonde eines cDNA Normalgewebe-Pools aus 15 Normalgeweben (Knochenmark, Herz, Niere, Leber, Lunge, Pankreas, Skelettmuskel, Milz, Thymus, Dünndarm, Magen, Lymphknoten, Brustdrüse, Prostata und Trachea) hybridisiert.

Der Vergleich der Image Bilder und der Autoradiographien bzw. der Nettocounts der jeweils differenziert hybridisierten Spots eines Sets erlaubte die Auswahl von Klonen, deren mRNA nur im Tumor gegenüber Normalgewebe überexprimiert oder aber sowohl im Tumor als auch in Testis (als Vertreter eines immunprivilegierten Gewebes) transkribiert werden. Erstere sind Kandidaten der Klasse der "Tumor"-, letztere der Klasse der "Tumor-Testis"-Antigene.

Beispiel 3:

DNA-Sequenzierung und Annotation von "Tumor"- und "Tumor-Testis"-Antigen-Kandidaten

Die Plasmid-DNA von 234 Klonen, die aufgrund der in Beispiel 2 erhaltenen Ergebnisse ausgewählt worden waren, wurde entsprechend den Herstellerangaben (QIAgen) isoliert und nach der Sanger-Methode auf einem ABI-Prism Gerät sequenziert. Die so ermittelten Sequenzen wurden mittels BLAST-Search (National Center for Biotechnology Information) annotiert und EST-Datenbankvergleichen unterzogen. Das erlaubte die Identifizierung von 198 bekannten und 36 unbekannten Genen. Für letztere existierten lediglich EST-Einträge. Für die 36 unbekannten Gene wurde eine Abschätzung des Expressionsprofils vorgenommen: dabei wurde für alle in Datenbanken ESTs mit $> 95\%$ Identität (BLAST) zur experimentell ermittelten Sequenz das Ausgangsgewebe für die entsprechende cDNA-Bibliothek überprüft. Es wurde eine Unterteilung in i) kritische Normalgewebe, ii) foetale, "verzichtbare" und immunprivilegierte Gewebe und iii) Tumore und Tumorzelllinien vorgenommen. Auf der Basis dieses "virtuellen mRNA-Profiles" wurden 10 Klone für eine weitere experimentelle Analyse ausgewählt.

Beispiel 4

Transkriptionelle Analyse der Kandidaten-Klone in Tumor- und Normalgewebe

Zwischen 2 und 5 μg total-RNA aus Tumor- oder Normalgeweben wurden mittels SuperScriptII (GibcoBRL) oder AMV-RT (Promega) entsprechend den Herstellerempfehlungen revers transkribiert. Für jede individuelle RNA Probe wurde ein zweiter Ansatz ohne reverse Transkriptase als Kontrolle für Kontamination durch chromosomale DNA durchgeführt. Qualität und Menge der cDNAs wurde durch PCR mit β -Actin spezifischen Primern (SEQ ID NO:3 und 4) und GAPDH spezifischen Primern (SEQ ID NO:5 und 6) nach 30 und 35 Zyklen (1° 95°C , 1° 55°C , 17° 72°C), überprüft. Die 10 Kandidatengene wurden analog mit jeweils spezifischen Primern analysiert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Dabei zeigte ein Kandidat, der mit "C42" bezeichnet wurde, nach 30 Zyklen mit C42-spezifischen Primern (SEQ ID NO:7 und 8) ein relativ spezifisches Tumor/Testis-Transkriptionsprofil; die semiquantitative RT-PCR von RNA aus Mammakarzinom, Lungen-Adenokarzinom, Lungen-Plattenepithelkarzinom, Nierenkarzinom, Kolonkarzinom, Herz, Lunge, Leber, Niere, Kolon, Milz und Testis ist in Fig. 1 dargestellt). Dieser Klon C42, der ein Insert von 549 bp enthält, wurde in der Folge einer detaillierteren Analyse unterworfen.

Beispiel 5

Transkriptionsprofil von C42 in Tumor- und Normalgeweben

Für die Northern Blot Analyse wurden Human Multiple Tissue Northern Blots (Clontech, Palo Alto) und (Invitrogen) mit dem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (NEN, Boston) markierten 549 bp langen C42 PCR Produkt bei 68° für 2 h hybridisiert. Die Visualisierung erfolgte durch Standard-Autoradiografie (Hyperfilm, Amersham). Fig. 2 zeigt das Ergebnis dieser Analyse: von 20 Normalgeweben (Pankreas, Adrenal Medulla, Schilddrüse, Adrenal Cortex, Testes, Thymus, Dünndarm, Magen, Hirn, Herz, Skelettmuskel, Kolon, Milz, Niere, Leber, Placenta, Lunge, Leukozyten, Galle, Esophagus) und 4 Tumorgeweben (Adenokarzinom der Galle und des Magens sowie das Plattenepithelkarzinom des Esophagus und der Lunge). Für C42 zeigt sich in den Tumorgeweben des Plattenepithelkarzinoms von Esophagus und Lunge ein prominentes Transkript

von 4,4 kb Länge. In Normalgeweben zeigt sich lediglich im Esophagus ein schwaches Transkript von 4,4 kb Länge. Die geringe Intensität des Signals läßt eine immunologisch relevante Expression als unwahrscheinlich erscheinen. Ein weiteres Transkript von 3,5 kb, welches möglicherweise eine Spleißvariante des 4,4 kb Transkripts darstellt oder von einem homologen Gen abgeleitet ist, wurde ebenfalls in beiden Tumoren, nicht aber in Normalgeweben identifiziert (Fig. 2). Die Präsenz des TAA "C42" im Plattenepithelkarzinom der Lunge und des Esophagus ist in guter Übereinstimmung mit dem ursprünglich für die RDA eingesetzten Ausgangsmaterial (Pool von 5 verschiedenen Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge) und weist auf ein TAA hin, das spezifisch für diese Art von Karzinomen sein dürfte.

Beispiel 6

Klonierung der C42-cDNA

Zur Klonierung der humanen C42-cDNA wurde wie folgt vorgegangen: ein BLAST-Search ergab folgende, zu dem in Beispiel 4 erhaltenen C42-cDNA-Insert von 549 bp ("Originalfragment")überlappende ESTs: AA429919; AA430055; AA446075; AA430254; AA160879. Ausgehend von der Sequenz AA430055 wurde mit dem EstExtractor auf TIGEMNet (<http://gcg.tigem.it/cgi-bin/uniestass.pl>) ein mit dem Klon C42 überlappendes Contig gefunden. Die Überlappung des Contigs und der Sequenz des in Beispiel 4 erhaltenen Originalfragments von 549 bp (SEQ ID NO:19) konnte durch PCR-Amplifikation mit einem C42 spezifischen Primer und einem am V-Ende des Contig liegenden Primer (SEQ ID NO:11 und 12) in Lungentumor cDNA verifiziert werden. Mit Hilfe der mit dem Originalfragment von C42 überlappenden Sequenzen AA430246 und AA446075 wurde eine Verlängerung in die 5'-Richtung erhalten. Durch zwei hintereinander geschaltete PCRs mit dem Primerpaar (SEQ ID NO:13 und 14) für die erste PCR und mit dem Primerpaar (SEQ ID NO:15 und 16) für die "nested"-PCR wurden aus der SuperScript™ Human Testis cDNA Library (GibcoBRL) weitere zu C42 gehörende Fragmente unter Verwendung des Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) und dem dort beschriebenen Standardprotokoll amplifiziert. Ausgehend von dieser neuen Sequenz konnten drei weitere zu C42 gehörende EST-Eintragen gefunden werden: A1493356; AA443218; AA443258. Die Kenntnis dieser neuen Sequenzen ermöglichte wiederum zwei weiter stromaufwärts hintereinander geschaltete PCRs mit dem Primerpaar (SEQ ID NO:13 und 17) für die erste PCR und mit dem Primerpaar (SEQ ID NO:15 und 18) für die nach innen versetzte "nested"-PCR. Dadurch konnten weitere C42-Fragmente kloniert werden.

Für die Sequenzanalyse wurden Aliquots der PCR-Ansätze direkt in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen) ligiert und anschließend in kompetente E. coli (OneShot™, Invitrogen) transformiert und wie oben beschrieben sequenziert.

Die Sequenz von C42 zeigt sowohl auf Nukleotid- als auch Proteinebene eine eindeutige Homologie zu einer Genfamilie von Ca^{2+} -aktivierbaren Cl^- -Kanalproteinen, die in verschiedenen Spezies (teilweise sehr gewebsspezifisch) exprimiert werden. 5 Vertreter dieser Familie wurden bislang kloniert und partiell charakterisiert; die beiden Rindergene bCLCA1 ("bovine Ca^{2+} -activated Cl^- channel-1"; Cunningham et al., 1995) und Lu-ECAM-1 ("bovine lung-endothelial cell adhesion molecule-1"; Elble et al., 1997), das Mausgen mCLCA1 ("murine Ca^{2+} -activated Cl^- channel-1; Gandhi, et al., 1998) und die beiden humanen Gene hCLCA1 ("human Ca^{2+} -activated Cl^- channel; Gruber et al., 1998) und hCLCA3 ("human Ca^{2+} -activated Cl^- channel-3; Gruber et al., 1999). Alle Vertreter dieser Proteinfamilie weisen typische Transmembranbereiche auf und werden nach dem derzeitigen Wissensstand mit Ausnahme von hCLCA3 posttranslational gespalten, um Heterodimere zu bilden, wobei der C-terminale Teil glycosyliert wird (Elble et al., 1997). Das bovine Lu-ECAM-1 ermöglicht z. B. die Bindung der B16F10-Lungenmetastasen des Maus-Melanoms an Endothelzellen (Zhu et al., 1992).

Bei C42 handelt es sich um einen neuen humanen Vertreter dieser Proteinfamilie. Der erhaltene 3'-terminale Abschnitt der C42-cDNA besitzt einen für 742 Aminosäuren kodierenden durchgehenden Leserahmen, der den C-terminalen Abschnitt von C42 repräsentiert. Die Sequenz weist die für die Proteinfamilie typische hydrophobe Transmembranregionen auf (Positionen Nr. 136–160, 232–252, 320–340 und 427–450 in SEQ ID NO:2), besitzt aber zum Unterschied zu den anderen Vertretern einen C-Terminus der von stark geladenen Aminosäuren aufgebaut wird.

Der klonierte Bereich der C42-cDNA beträgt 2454 bp, wobei das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA in diesem Bereich spricht.

Beispiel 7

Potentielle MHC-Bindungspeptide in der für den C-terminalen Teil von C42 kodierenden Region

Potentielle Peptid-Epitope innerhalb der kodierenden Region des C-terminalen Fragmentes von C42 gemäß (SEQ ID NO:2) wurden mittels den von Parker et. al., 1994 beschriebenen Algorithmen unter Zugrundelegung bekannter Motive (Rammensee et al. 1995) durchgeführt. Für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1, -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, wurden 9-mer Kandidaten-Peptide identifiziert, von denen zu erwarten ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die ermittelten Peptide sind in Tab. 1 aufgelistet. Durch analoges Vorgehen können weitere potentielle Peptid-Epitope für andere HLA-Typen bzw. 8- und 10-mer Peptide ermittelt werden.

DE 199 24 199 A 1

Tabelle 1

Immunogene Peptid-Kandidaten des C-terminalen Fragmentes von C42 (742 Aminosäuren)

Start- position in SEQ ID NO: 2	Sequenz	HLA
19	KLFKEGCTF	A3
21	FKEGCTFIY	A1
41	FMQSLSSVV	A*0201
63	NLQNQMCSL	A*0201
76	DVITDSADF	A3
93	TELPPPPTF	B*4403
95	LPPPPTFSL	B7
102	SLVQAGDKV	A*0201
112	CLVLDVSSK	A3
120	KMAEADRL	A*0201
125	DRLLQLQQA	B14
129	QLQQAEEFY	A3
130	LQQAEEFY	A*0201
140	QIVEIHTFV	A*0201

DE 199 24 199 A 1

5	155	SKGEIRAQL	B14
	170	DDRKLLVSY	B*4403
10	171	DRKLLVSYL	B14
	173	KLLVSYLPT	A*0201
15	178	YLPTTVSAK	A3
	200	EVVEKLNGK	A3
20	202	VEKLNGKAY	B*4403
	215	ILVTSGDDK	A3
25	224	LLGNCLPTV	A*0201
30	254	ELSRLTGGL	A*0201
	288	DIFQQHIQL	B14
35	295	QLESTGENV	A*0201
40	302	NVKPHHQLK	A3
	338	ILFDPDGRK	A3
45	339	LFDPDGRKY	A1
50	362	SLWIPGTAK	A3
	370	KPGHWYTL	B7
55	384	SLQALKVTV	A*0201
	407	EAFVGRDSL	B7, B14
60	409	FVGRDSLHF	A3

65

447	TGDPVTLRL	A1	
466	KNDGIYSRY	A1	5
482	GRYSLKVHV	B14	10
521	QMNA PRKSV	A*0201	
532	NEEERKWGF	B*4403	15
563	FPPCKIIDL	B7, B14	20
591	FDQGQATSY	B*4403	
606	SLQNIQDDF	A3	25
652	NGETHESHR	A1	
665	IRAMDRNSL	B14	30
690	NSDPVPARD	A1	35
691	SDPVPARDY	B*4403	
692	DPVPARDYL	B7, B14	40
694	VPARDYLIL	B7	45
709	MGLIGIICL	B14	
733	DKKENGTKL	B14	50

Literatur

- Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga, J., and Knop, J. (1997), J. Immunol. Methods 203, 171–180. 55
- Blake, J., Johnston, J. V., Hellström, K. E., Marquardt, H., and, Chen, L. (1996), J. Exp. Med. 184, 121–130.
- Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, and A. Van Pel (1994), Annu. Rev. Immunol. 12: 337–365
- Boon T, (1998), Tumor antigens recognized by cytolytic T cells. Cancer Vaccine Week – International Symposium, New York, Oct 1998; abstract S01 60
- Boulianne, G. L., et al., (1984), Nature 312, 634–646
- Brüggemann, M. und Neuberger, M. S., (1996), Immunol. Today 17, 391–397
- Buschle, M, Schmidt, W, Zauner, W, Mechler, K, Trska, B, Kiriappos, H, Birnstiel, M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 3256–3261 65
- Celluzzi, CM and Falo, LD, Jr. (1998), J. Immunol. 160, 3081–3085
- Chen; Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 1914–1918.

- Coulie, P. G. (1997), *Mol. Med. Today* 3, 261–268
- Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow, TL, Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, and Slingluff, CL, Jr. (1994), *Science* 264, 716–719
- Cunningham SA, Awayda MS, Bubien JK, Ismailov II, Arrate MP, Berdiev BK, Benos DJ, Fuller CM (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 31016–31026
- 5 Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., and Siebert, P. D. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6025–6030.
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3539–3543.
- 10 Elble, R., Widom, J., Gruber, A. D., Abdel-Ghany, M., Levine, R., Goodwin, A., Cheng, H.-C., and Pauli, B. U. (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 27853–27861.
- Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, and Boger, J (1985), *J. Virol.* 55, 836–839
- Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G., and Rammensee, H-G (1991), *Nature* 351, 290–296.
- Fearon, E. R., Pardoll, D. M., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H. I., Simons, J. W., Karasuyama, H., Vogelstein, B., and Frost, P. (1990), *Cell* 60, 397–403.
- 15 Gandhi, R., Elble, R. C., Gruber, A. D., Ji, H.-J., Copeland, S. M., Fuller, C. M., and Pauli, B. U. (1998), *J. Biol. Chem.* 273, 32096–32101.
- Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K., Bannerji, R., and Gilboa, E. (1990), *J. Exp. Med.* 172, 1217–1224.
- Graziano, R. F., et al., (1995), *J. Immunol.* 155, 4996–5002
- 20 Griffiths, A. D., et al., (1994), *EMBO J.* 13, 3245–3260
- Gruber, A. D., Elble, R. C., Ji, H.-J., Schreur, K. D., Fuller, C. M., and Pauli, B. U. (1998), *Genomics* 54, 200–214.
- Gruber, A. D. and Pauli, B. U. (1999), *Biochim. Biophys. Acta* 1444, 418–423.
- Halliday, GM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, FJ, and Barnetson RS (1995), *World J. Surg.* 19, 352–358
- Hubank, M., and Schatz, D. G., (1994), *Nucleic. Acids. Res.* 22, 5640–5648.
- 25 Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stokert, E., Old, L. J., and Knuth, A. (1998), *J. Exp. Med.* 187, 265–270.
- Jakovovits, A., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 561–566
- Jameson, BA and Wolf, H (1988), The antigenic Index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4, 181–186
- 30 Jessup, JM and Loda, M (1998), Prognostic markers in rectal carcinoma. *Semin. Surg. Oncol.* 15, 131–140.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., King, X., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1995), *J. Immunol.* 154, 3961–3968.
- Kawakami, Y, Robbins, PF, and Rosenberg, SA (1996), *Keio J. Med.* 45, 100–108
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975), *Nature* 256, 495–497
- 35 Kruif, J., et al., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3938–3942
- Kyte, J and Doolittle, RF (1982), *J. Mol. Biol.* 157, 105–132
- Lethe, B, Lucas, S, Michaux, L, De Smet, C, Godelaine, D, Serrano, A, De Plaen, E, and Boon, T (1998), *Int. J. Cancer* 76, 903–908
- Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure F, Viel S. and Hercend T (1993), *Cancer Res.* 53, 3569–3573
- 40 Marchand M, Weynants P, Rankin E et al (1995), *Int. J. Cancer* 63 : 883–885
- Mayordomo, J. I., Zorina, T., Storkus, W. J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Faló, L. D., Melief, C. J., Ildstad, S. T., Kast, W. M., DeLeo, A.B., and Lotze, M. T. (1995), *Nature Medicine* 1, 1297–1302.
- McGuinness, B. T., et al., (1996), *Nature Biotechnol.* 14, 1149
- Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 8, 651–657
- 45 Murphy, G. P., Elgamil, A. A., Su, S. L., Bostwick, D. G., and Holmes, E. H. (1998), *Cancer* 83, 2259–2269
- Neuberger, M. S., et al., (1984), *Nature* 312, 604–608
- Pardoll, D. M. (1998), *Nature Medicine* 4, 525–531
- Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. (1994), *J. Immunol.* 152, 163.
- Parkhurst, M. R., Salgaller, M. L., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Rosenberg, S. A., and Kawakami, Y. (1996),
- 50 *J. Immunol.* 157, 2539–2548.
- Paterson Y, Ikonomidis G (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 5, 664–669
- Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995), *Immunogenetics* 41, 178–228
- Rapellino, M, Pecchio, F, Baldi, S, Scappaticci, E, and Cavallo, A (1995), *Anticancer Res.* 15, 1065–1070
- Ravaioli, A., Bagli, L., Zucchini, A., and Monti, F. (1998), *Cell. Prolif.* 31, 113–126
- 55 Revillion, F, Bonnetterre, J, and Peyrat, JP (1998), *Eur. J. Cancer* 34, 791–808
- Restifo NP (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 5, 658–63
- Riechmann, L., et al., (1988), *Nature* 332: 323–327
- Robbins, PF and Kawakami, Y (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 8, 628–636
- Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R. T., Grey, H. M., and Sette, A. (1993), *Cell* 74, 929–937.
- 60 Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11810–11813
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989
- Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmuller G, and Segurado OG (1993), *J. Immunol.* 151, 4209–4220
- 65 Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kirlappos H, Mechtler K, Trska B, Birnstiel M (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3262–3267
- Schweighoffer, T. (1997), *Onc. Res.* 3, 164–176

- Sette, A., Vitiello, A., Rehman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W. M., Melief, C. J. M., Oseroff, C., Yuan, L., Rupert, J., Sidney, J., del Guercio, M.-F., Southwood, S., Kubo, R. T., Chesnut, R. W., Grey, H. M., and Chisari, F. V. (1994), *J. Immunol.* 153, 5586–5592.
- Stauss, H. J., Davies, H., Sadovnikova, E., Chain, B., Horowitz, N., and Sinclair, G. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7871–7875. 5
- Tepper, R. I., Pattengale, P. K., and Leder, P. (1989), *Cell* 57, 503–512.
- Tighe H, Corr, M, Roman M, and Raz E (1998), *Immunol. Today* 19, 89–97
- Toes, R. E., Hoeben, R. C., Van der Voort, E., Rensing, M. E., Van-der-Eb, A. J. Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14660–14665
- Tuting, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T., and Storkus, W. J., (1997), *Eur. J. Immunol.* 27, 2702–2707, 10
- Van den Eynde, B. and Brichard, V. G. (1995), *Curr. Opin. Immunol.* 7, 674–681.
- Van den Eynde, BJ, and van der Bruggen, P (1997), *Curr. Opin. Immunol.* 9, 684–693
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. (1991), *Science* 254, 1643–1647
- van der Burg, S. H., et al., (1996), *J. Immunol.* 156, 3308–3314 15
- van Elsas, A., van der Minne, C. E., Borghi, M., van der Spek, C. W., Braakman, E., Osanto, S., and Schrier, P. I. (1996), CTL Recognition of an IL-2 Producing Melanoma Vaccine. In: *Immunology of human melanoma. Tumor-host interaction and immunotherapy*, edited by M. Maio, Amsterdam: IOS, 1996, p. 165–173
- van Elsas, A., Aarnoudse, C., von der Minne, C. E., von der Spek, C. W., Brouwenstijn, N., Osanto, S., and Schrie P. I. (1997), *J. Immunother.* 20, 343–353. 20
- Vaughan, T. J., et al., (1998), *Nature Biotechnol.* 16, 535–539
- Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, KW (1995), *Science* 270, 484–487
- Wang, L., et al., (1997), *Mol. Immunol.* 34, 609–618
- Wang, RF (1997), *Mol. Med.* 3, 715–731
- Winter, G., et al., (1994), *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433–455 25
- Woelfel, T., Schneider, J., Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O., and Falk, K. (1994), *Int. J. Cancer* 57, 413–418
- Wu, T. C., Guarnieri, F. G., Staveley-O'Carroll, K. F., Viscidi, R. P., Levitsky, H. I., Hedrick, L., Cho, K. R., August, J. T., and Pardoll, D. M. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11671–11675.
- Zitvogel, L., Mayordomo, J. I., Tjandrawan, T., DeLeo, A.B., Clarke, M.R., Lotze, M. T., and Storkus, W.J. (1996), *J. Exp. Med.* 183, 87–97. 30
- Zhu, D., Cheng, C.-F., and Pauli, B.U. (1992), *J. Clin. Invest.* 89, 1718–1724.

35

40

45

50

55

60

65

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
- (A) NAME: Boehringer Ingelheim International GmbH
 - (B) STRASSE: Binger Strasse 173
 - (C) ORT: Ingelheim am Rhein
 - (E) LAND: DE
 - (F) POSTLEITZAHL: D-55216
 - (G) TELEFON: +49-6132-772282
 - (H) TELEFAX: +49-6132774377
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Tumorassoziiertes Antigen
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 69
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 2454 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 - (F) GEWEBETYP: Testis
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
- (B) CLON(E): C42
- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/Schlüssel:
 - (B) (B) LAGE
 - (D) SONSTIGE ANGABEN:/Funktion = "offener Leserahmen, hypothetische kodierende Region"
- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/Schlüssel: 3'NTR
 - (B) (B) LAGE: 2229-2454

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/Schlüssel: CDS

(B) LAGE: 3-2228

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CAGGCATTTTTGTGTGTGAAAAAGGTCCTTGCCCCCAAGAAAAGTGTATTATTAGTAAGCTTTTTTAA
AGAAGGATGCACCTTTATCTACAATAGCACCCAAAATGCAACTGCATCAATAATGTTTCATGCAAAGT
TTATCTTCTGTGGTTGAATTTTGTAAATGCAAGTACCCACAACCAAGAAGCACCACCTACAGAACC
AGATGTGCAGCCTCAGAAGTGCATGGGATGTAATCACAGACTCTGCTGACTTTCACCACAGCTTTCC
CATGAATGGGACTGAGCTTCCACCTCCTCCACATTCTCGCTTGACAGGCTGGTGACAAAGTGGTC
TGTTTAGTGCTGGATGTGTCCAGCAAGATGGCAGAGGCTGACAGACTCCTTCAACTACAACAAGCCG
CAGAATTTTATTTGATGCAGATTGTTGAAATTCATACCTTCGTGGGCATTGCCAGTTTCGACAGCAA
AGGAGAGATCAGAGCCCAGCTACACCAAATTAACAGCAATGATGATCGAAAGTTGCTGGTTTCATAT
CTGCCCACCACTGTATCAGCTAAACAGACATCAGCATTGTTCAGGGCTTAAGAAAGGATTTGAGG
TGGTTGAAAAACTGAATGGAAAAGCTTATGGCTCTGTGATGATATTAGTGACCAGCGGAGATGATAA
GCTTCTTGGCAATTGCTTACCCACTGTGCTCAGCAGTGGTTCAACAATCACTCCATTGCCCTGGGT
TCATCTGCAGCCCCAAATCTGGAGGAATTATCACGTCTTACAGGAGGTTTAAAGTTCTTTGTTCCAG
ATATATCAAACCTCCAATAGCATGATTGATGCCTTCAGTAGAATTTCTCTGGAAGTGGAGACATTTT
CCAGCAACATATTCAGCTTGAAAGTACAGGTGAAAATGTCAAACCTCACCATCAATTGAAAAACACA
GTGACTGTGGATAATACTGTGGGCAACGACACTATGTTTCTAGTTACGTGGCAGGCCAGTGGTCCTC
CTGAGATTATATTATTTGATCCTGATGGACGAAAATACTACACAAATAATTTTATCACCAATCTAAC
TTTTCGGACAGCTAGTCTTTGGATTCCAGGAACAGCTAAGCCTGGGCACTGGACTTACACCCTGAAC
AATACCCATCATTCTCTGCAAGCCCTGAAAGTGACAGTGACCTCTCGTGCCTCCAAGTCAAGTGTGC
CCCCAGCCACTGTGGAAGCCTTTGTGGGAAGAGACAGCCTCCATTTTCTCATCCTGCGATGATTTA
TGCCAATGTGAAACAGGGATTTTATCCCATTCTTAATGCCACTGTCACTGCCACAGTTGAGCCAGAG
ACTGGAGATCCTGTTACGCTGAGACTCCTTGATGATGGAGCAGGTGCTGATGTTATAAAAAATGATG
GAATTTACTCGAGGTATTTTTTCTCCTTTGCTGCAATGGTAGATATAGCTTGAAAGTGCATGTCAA
TCACTCTCCAGCATAAGCACCCCAGCCACTCTATTCCAGGGAGTCATGCTATGTATGTACCAGGT
TACACAGCAAACGGTAATATTCAGATGAATGCTCCAAGGAAATCAGTAGGCAGAAATGAGGAGGAGC
GAAAGTGGGGCTTTAGCCGAGTCAGCTCAGGAGGCTCCTTTTCACTGCTGGGAGTTCCAGCTGGCCC
CCACCCTGATGTGTTTCCACCATGCAAAATTATTGACCTGGAAGCTGTAAAAGTAGAAGAGGAATTG
ACCCTATCTTGGACAGCACCTGGAGAAGACTTTGATCAGGGCCAGGCTACAAGCTATGAAATAAGAA
TGAGTAAAAGTCTACAGAATATCCAAGATGACTTTAACAATGCTATTTTAGTAAATACATCAAAGCG
AAATCCTCAGCAAGCTGGCATCAGGGAGATATTACGTTCTCACCCCAAATTTCCACGAATGGACCT
GAACATCAGCCAAATGGAGAAACACATGAAAGCCACAGAATTTATGTTGCAATACGAGCAATGGATA
GGAATCCTTACAGTCTGCTGTATCTAACATTGCCAGGCGCCTCTGTTTATTCCCCCAATTCTGA
TCCTGTACCTGCCAGAGATTATCTTATATTGAAAGGAGTTTTAACAGCAATGGGTTTGATAGGAATC
ATTTGCCTTATTATAGTTGTGACACATCATACTTTAAGCAGGAAAAAGAGAGCAGACAAGAAAGAGA

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 199 24 199 A 1

ATGGAACAAAATTATTATAAATAAATATCCAAAGTGTCTTCCTTCTTAGATATAAGACCCATGGCCT
TCGACTACAAAAACATACTAACAAAGTCAAATTAACATCAAAACTGTATTAAATGCATTGAGTTTT
5 TGTACAATACAGATAAGATTTTTACATGGTAGATCAACAAATCTTTTTGGGGGTAGATTAGAAAAC
CCTTACACTTTGGCTATGAACAAATAATAAAATTATTCTTT

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 742 Aminosäuren

15 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GIFVCEKGPC PQENCIISKL FKEGCTFIYN STQNATASIM FMQSLSSVVE
25 FCNASTHNQE APNLQNQMCS LRSADVITD SADFHHSFPM NGTELPPTPT
FSLVQAGDKV VCLVLDVSSK MAEADRLQL QQADEFYLMQ IVEINTFVGI
ASFDSKGEIR AQLHQINSND DRKLLVSYLP TTVSAKTDIS ICSGLKKGFE
VVEKLNGKAY GSVMLVTSG DDKLLGNCLP TVLSSGSTIH SIALGSSAAP
30 NLEELSRLTG GLKFFVPDIS NSNSMIDAFS RISSGTGDIF QQHIQLESTG
ENVKPHHQLK NTVTVDNVTG NDTMFLVTWQ ASGPPEIILF DPDGRKYYTN
NFIITNLFTFRT ASLWIPGTAK PGHWTYTLNN THHSLQALKV TVTSRASNSA
35 VPPATVEAFV GRDSLHFPHP AMIYANVKQG FYPIFNATVT ATVEPETGDP
VTLRLDDGA GADVIKNDGI YSRYFFSFAA NGRYSLKVHV NHSPSISTPA
HSIPGSHAMY VPGYTANGNI QMNAPRKSVG RNEEERKWGF SRVSSGGSFS
40 VLGVPAGPHP DVFPCKIID LEAVKVEEEL TSWTAPGED FDQQQATSYE
IRMSKSLQNI QDDFNNAILV NTSKRNPQQA GIREIFTFSP QISTNGPEHQ
PNGETHESHR IYVAIRAMDR NSLQSAVSNI AQAPLFIPPN SDPVVPARDYL
45 ILKGVLTAMG LIGIICLIIV VTHHTLSRKK RADKKENGTK LL 742

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 bp

55 (B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

60 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

tgacgggggtcaccacactgtgcccatcta 30

65

DE 199 24 199 A 1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 bp
- (B) ART: Nukleinsäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ctagaagcattgCGGTGGACGATGGAGGG

29

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 bp
- (B) ART: Nukleinsäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

aaggtgaaggtCGGAGTCAACG

22

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 bp
- (B) ART: Nukleinsäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ggcagagatgatgacccttttggc 24

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 bp
- (B) ART: Nukleinsäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

60

65

DE 199 24 199 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGAATTGACCCTATCTTGGACAGCAC 26

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 bp
- (B) ART: Nukleinsäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

20 AGAGGCGCCTGGGCAATGTTAGATA 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 bp
- (B) ART: Nukleinsäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

35 GGATATCTGCAGAATTCGGCT 21

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 bp
- (B) ART: Nukleinsäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

50

CAGTGTGCTGGAATTCGGC 19

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 bp
- (B) ART: Nukleinsäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

60

65

DE 199 24 199 A 1

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:		5
CAGTCTGCTGTATCTAACATTGCCCA	26	
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:		10
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 28 bp		
(B) ART: Nukleinsäure		15
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:		20
TTTGTTTCATAGCCAAAGTGTAAGGGTTT	28	
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:		25
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 22 bp		
(B) ART: Nukleinsäure		30
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:		35
GGTGACACTATAGAAGGTACGC	22	
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:		40
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 27 bp		45
(B) ART: Nukleinsäure		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid		50
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:		
CACTTTCGCTCCTCCTCATTCTGCCT	27	55
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:		
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		60
(A) LÄNGE: 20 bp		
(B) ART: Nukleinsäure		

65

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CCTGCAGGTACCGGTCCGGA 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 bp
(B) ART: Nukleinsäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CTGAATATTACCGTTTGCTGTGTAACT 28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 bp
(B) ART: Nukleinsäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

GACATTTTCACCTGTACTTTCAAGCT 26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 bp
(B) ART: Nukleinsäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

GTTCCAGAGGAAATTCTACTGAAGCA 27

DE 199 24 199 A 1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 549 bp

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

ACCAGGTTACACAGCAAACGGTAATATTCAGATGAATGCTCCAAGGAAATCAGTAGGCAGAAATGAG
GAGGAGCGAAAGTGGGGCTTTAGCCGAGTCAGCTCAGGAGGCTCCTTTTCAGTGCTGGGAGTCCAG
CTGGCCCCCACCCTGATGTGTTCCACCATGCAAAATTATTGACCTGGAAGCTGTAAAAGTAGAAGA
GGAATTGACCCTATCTTGGACAGCACCTGGAGAAGACTTTGATCAGGGCCAGGCTACAAGCTATGAA
ATAAGAATGAGTAAAAGTCTACAGAATATCCAAGATGACTTTAACAATGCTATTTTAGTAAATACAT
CAAAGCGAAATCCTCAGCAAGCTGGCATCAGGGAGATATTTACGTTCTACCCCCAAATTTCCACGAA
TGGACCTGAACATCAGCCAAATGGAGAAACACATGAAAGCCACAGAATTTATGTTGCAATACGAGCA
ATGGATAGGAACCTCCTTACAGTCTGCTGTATCTAACATTGCCCAGGCGCCTCTGTTTATCCCCCA
ATTCTGATCCTGT

549

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:

Lys Leu Phe Lys Glu Gly Cys Thr Phe

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:21:

Phe Lys Glu Gly Cys Thr Phe Ile Tyr

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:22:
 Phe Met Gln Ser Leu Ser Ser Val Val

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:23:
 Asn Leu Gln Asn Gln Met Cys Ser Leu

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:24:
 Asp Val Ile Thr Asp Ser Ala Asp Phe

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:25:
 Thr Glu Leu Pro Pro Pro Pro Thr Phe

DE 199 24 199 A 1

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:26:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

5

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:26:

10

Leu Pro Pro Pro Pro Thr Phe Ser Leu

15

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

20

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:27:

25

Ser Leu Val Gln Ala Gly Asp Lys Val

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:28:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

35

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:28:

40

Cys Leu Val Leu Asp Val Ser Ser Lys

45

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:29:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

50

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:29:

55

Lys Met Ala Glu Ala Asp Arg Leu Leu

60

65

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:30:
 Asp Arg Leu Leu Gln Leu Gln Gln Ala

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:31:
 Gln Leu Gln Gln Ala Ala Glu Phe Tyr

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:32:
 Leu Gln Gln Ala Ala Glu Phe Tyr Leu

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:33:
 Gln Ile Val Glu Ile His Thr Phe Val

DE 199 24 199 A 1

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:34:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

5

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:34:

10

Ser Lys Gly Glu Ile Arg Ala Gln Leu

15

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:35:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

20

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:35:

25

Asp Asp Arg Lys Leu Leu Val Ser Tyr

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:36:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

35

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:36:

40

Asp Arg Lys Leu Leu Val Ser Tyr Leu

45

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:37:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

50

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:37:

55

Lys Leu Leu Val Ser Tyr Leu Pro Thr

60

65

DE 199 24 199 A 1

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:38:

- 5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- 10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:38:
- Tyr Leu Pro Thr Thr Val Ser Ala Lys

15

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:39:

- 20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- 25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:39:
- Glu Val Val Glu Lys Leu Asn Gly Lys

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:40:

- 35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- 40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:40:
- Val Glu Lys Leu Asn Gly Lys Ala Tyr

45

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:41:

- 50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- 55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:41:
- 60 Ile Leu Val Thr Ser Gly Asp Asp Lys

65

DE 199 24 199 A 1

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:42:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

5

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:42:

10

Leu Leu Gly Asn Cys Leu Pro Thr Val

15

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:43:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

20

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:43:

25

Glu Leu Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:44:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

35

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:44:

40

Asp Ile Phe Gln Gln His Ile Gln Leu

45

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:45:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

50

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:45:

55

Gln Leu Glu Ser Thr Gly Glu Asn Val

60

65

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:46:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:46:
Asn Val Lys Pro His His Gln Leu Lys

15

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:47:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:47:
Ile Leu Phe Asp Pro Asp Gly Arg Lys

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:48:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:48:
Leu Phe Asp Pro Asp Gly Arg Lys Tyr

45

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:49:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:49:
60 Ser Leu Trp Ile Pro Gly Thr Ala Lys

65

DE 199 24 199 A 1

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:50:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

5

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:50:

10

Lys Pro Gly His Trp Thr Tyr Thr Leu

15

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:51:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

20

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:51:

25

Ser Leu Gln Ala Leu Lys Val Thr Val

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:52:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

35

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:52:

40

Glu Ala Phe Val Gly Arg Asp Ser Leu

45

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:53:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

50

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:53:

55

Phe Val Gly Arg Asp Ser Leu His Phe

60

65

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:54:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:54:
 Thr Gly Asp Pro Val Thr Leu Arg Leu

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:55:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:55:
 Lys Asn Asp Gly Ile Tyr Ser Arg Tyr

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:56:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:56:
 Gly Arg Tyr Ser Leu Lys Val His Val

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:57:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:57:
 Gln Met Asn Ala Pro Arg Lys Ser Val

DE 199 24 199 A 1

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:58:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

5

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:58:

10

Asn Glu Glu Glu Arg Lys Trp Gly Phe

15

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:59:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

20

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:59:

25

Phe Pro Pro Cys Lys Ile Ile Asp Leu

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:60:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

35

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:60:

40

Phe Asp Gln Gly Gln Ala Thr Ser Tyr

45

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:61:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

50

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:61:

55

Ser Leu Gln Asn Ile Gln Asp Asp Phe

60

65

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:62:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:62:
Asn Gly Glu Thr His Glu Ser His Arg

15

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:63:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:63:
Ile Arg Ala Met Asp Arg Asn Ser Leu

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:64:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:64:
Asn Ser Asp Pro Val Pro Ala Arg Asp

45

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:65:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:65:
60 Ser Asp Pro Val Pro Ala Arg Asp Tyr

65

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:66:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren 5
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:66: 10

Asp Pro Val Pro Ala Arg Asp Tyr Leu

15

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:67:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren 20
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:67: 25

Val Pro Ala Arg Asp Tyr Leu Ile Leu

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:68:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren 35
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:68: 40

Met Gly Leu Ile Gly Ile Ile Cys Leu

45

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:69:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren 50
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:69: 55

Asp Lys Lys Glu Asn Gly Thr Lys Leu

60

Patentansprüche

1. Tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung C42, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die in SEQ ID NO: 2 definierte Aminosäuresequenz als Teilsequenz enthält. 65
2. Immunogenes Proteinfragment oder Peptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von dem in Anspruch 1 definierten tumorassoziierten Antigen abgeleitet ist.

3. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, das eine humorale Immunantwort auslöst.
4. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, das bzw. dessen Abbauprodukte durch MHC-Moleküle präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen.
5. Immunogenes Peptid nach Anspruch 4, ausgewählt aus der Gruppe von Peptiden gemäß SEQ ID NO: 20 bis 69.
6. Immunogenes (Poly)peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Immuntherapie von Krebserkrankungen in vivo oder ex vivo, wobei das (Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen des Patienten induziert, die C42 exprimieren.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie als wirksame Komponente ein oder mehrere immunogene (Poly)peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie verschiedene, von C42 abgeleitete immunogene Peptide enthält.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein oder mehrere von C42 abgeleitete Peptide in Mischung mit von anderen tumorassoziierten Antigenen abgeleiteten Peptiden enthält.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, daß die Peptide an mindestens zwei verschiedene HLA-Typen binden.
11. Isoliertes DNA-Molekül, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften des in Anspruch 1 definierten tumorassoziierten Antigens oder für Fragmente davon.
12. DNA-Molekül nach Anspruch 11, kodierend für ein immunogenes Polypeptid der Bezeichnung C42, das die in SEQ ID NO: 2 enthaltene Aminosäuresequenz enthält bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide.
13. DNA-Molekül nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz enthält oder daß es ein Polynukleotid ist oder dieses enthält, das mit einem Polynukleotid, enthaltend die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz, unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
14. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
15. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 11 bis 14, für die Immuntherapie von Krebserkrankungen, wobei das von dem DNA-Molekül exprimierte C42 (Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen des Patienten induziert, die C42 exprimieren.
16. Verwendung von Zellen, die das in Anspruch 1 definierte Antigen exprimieren, für die Herstellung einer Krebsvakzine.
17. Antikörper gegen ein in einem der Ansprüche 1 bis 5 definiertes (Poly)peptid.
18. Antikörper nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
19. Antikörper nach Anspruch 17 oder 18 für die Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen, die mit der Expression von C42 assoziiert sind.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig.1

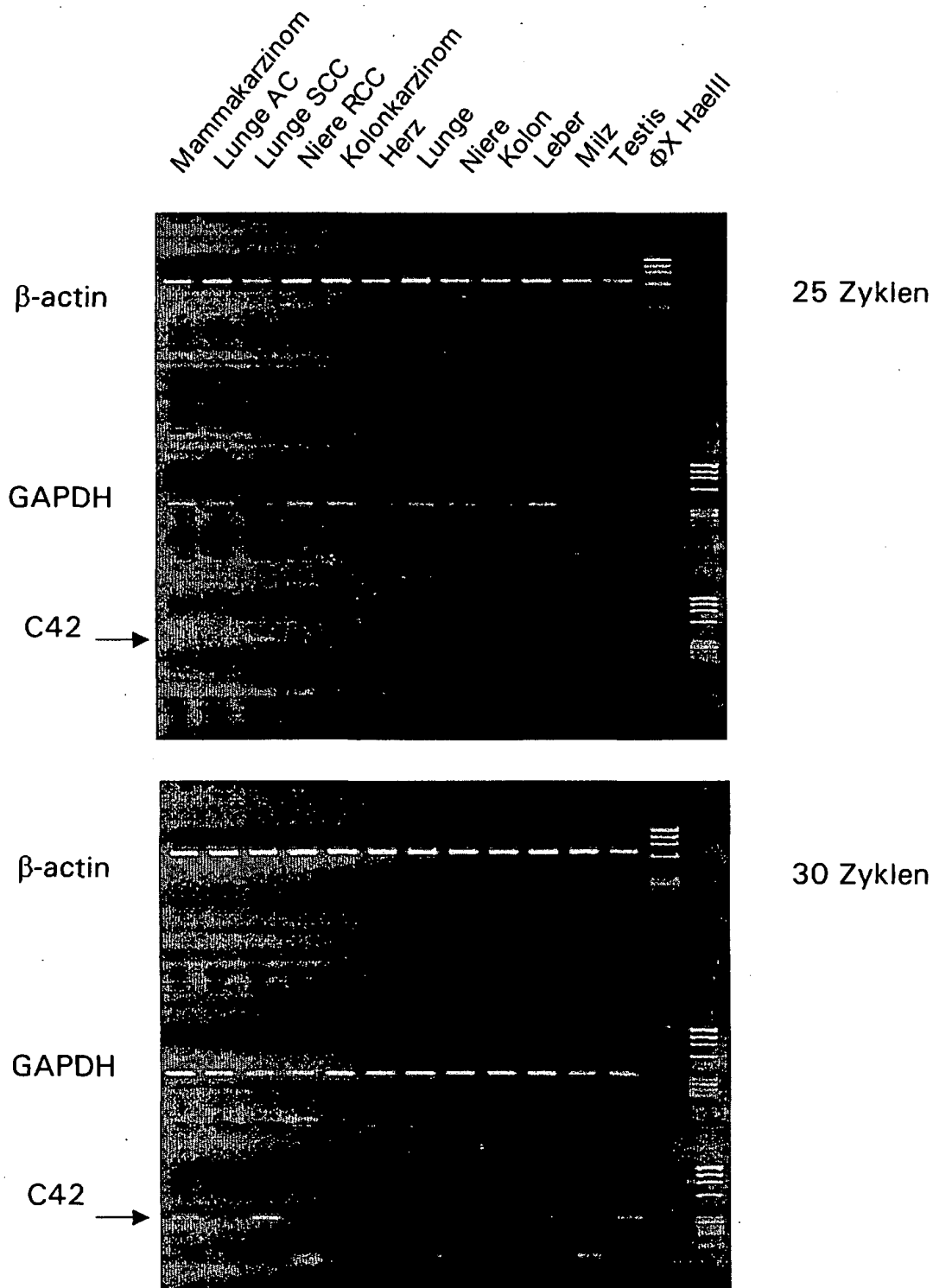


Fig. 2A

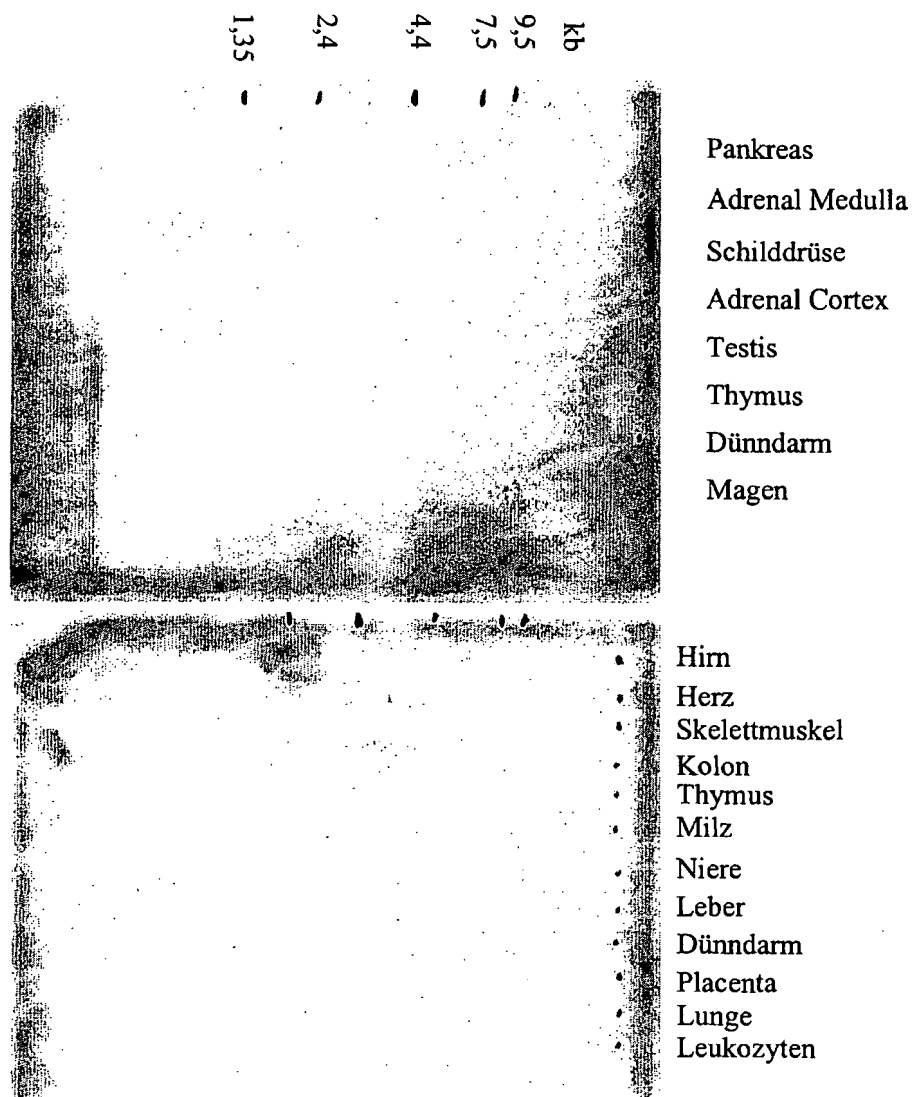


Fig. 2B

